

氏 名	吉次 博紀
学 位 の 種 類	博士(薬学)
学 位 記 番 号	博甲第849号
学位授与の日付	平成18年9月28日
学位授与の要件	課程博士 (学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	ヒト肝細胞キメラマウスを用いたヒト CYP 誘導能に関する研究
論文審査委員 (主査)	横井 毅 (医学系研究科・教授)
論文審査委員 (副主査)	辻 彰 (自然科学研究科・教授), 加藤 将夫 (自然科学研究科・助教授), 松下 良 (自然科学研究科・助教授), 中島 美紀 (医学系研究科・助教授)

### Summary

The prediction of drug-drug interaction potential was highly influenced by induction of drug-metabolizing enzymes. It was considered that human liver sample was expected to predict human drug metabolism.

I developed a highly sensitive analytic method to quantify mRNA levels in human hepatocytes. The mRNAs of about 120 human drug-metabolizing enzymes were measured. The mRNA expression of many human drug-metabolizing enzymes and transporters in the chimeric mouse liver was about 50% of that in the donor human liver. Furthermore, I investigated the expression of human CYPs mRNA in primary cultures of human hepatocytes and in chimeric mice constructed by transplanting hepatocytes from the same human donors. After 48 h of culture, expression of the human CYPs mRNA were very similar in human hepatocytes and chimeric mouse hepatocytes. I investigated the induction potency, as evaluated by CYP1A2 or CYP3A4 mRNA expression in human hepatocytes and chimeric mouse hepatocytes from three donors after exposure of  $\beta$ -naphthoflavone or rifampicin. Consequently, response to human CYPs mRNA expression in chimeric mouse hepatocytes were a little lower than those in human hepatocytes after exposure of probe drugs.

In conclusion, chimeric mouse hepatocytes that are able to identify the induction profiles of human hepatocytes are remarkable *in vitro* model, thus, the chimeric mouse liver would be alternatives to human liver.

薬物代謝酵素の誘導作用は薬物動態に大きな影響を与えるが、酵素機能の種差により動物実験からヒトの予測は困難な場合が多い。そのため、ヒト肝試料を用いた研究が医薬品開発における薬物の酵素誘導作用に重要な示唆を与えることができる。その中で、ヒト肝細胞は臨床での酵素誘導を予測する研究に利用され、有用性は広く認識されている。欧米において、ヒト肝細胞は遊離肝細胞やプレートに播種されて冷蔵により供給されているが、日本では肝臓試料を医薬品研究等の目的に提供することを移植法で規制しているため入手が難しく、海外から供給される凍結肝細胞が多く用いられている。近年、薬物動態実験に利用できる凍結ヒト肝細胞の研究が進んでおり、新鮮な肝細胞との CYP 酵素の活性を比較した研究(Li et al., 1999)や医薬品候補化合物を用いた研究(Hewitt et al., 2001)が報告され、新鮮な肝細胞と同様に凍結肝細胞においても薬物代謝能が保持されていることが示されている。そこで、ヒト凍結肝細胞を用いて、初代培養系での酵素誘導研究も試みられている (Roymans et al., 2004; Garcia et al., 2003)。さらに、培養肝細胞を用いた薬物代謝酵素活性の変化は mRNA 発現量の変動を見ることによっても確認できると考えられている。

本研究では、ヒト肝細胞の初代培養系における薬物代謝酵素およびトランスポーター mRNA の変動を捉えるために、リアルタイム RT-PCR による高感度解析法を開発した。分析のターゲットはファルマスニップコンソーシアムの頻度解析対象薬物動態関連遺伝子リストを参考とした。データベースに公開されている配列情報を元に、フォワードプライマー、リバースプライマーおよび TaqMan プローブを設計した。各配列設計の相同性は NCBI BLAST で検索し特異的であることを確認した。その結果、ヒト肝細胞において、55 種の第 1 相薬物代謝酵素、34 種の第 2 相薬物代謝酵素、30 種のトランスポーター mRNA の発現を確認した。次いで、誘導薬に対するヒト肝細胞の反応性は、リファンピシンまたはオメプラゾールを用いて検討した。リファンピシンの暴露により、CYP3A4 mRNA は 50  $\mu$ M 最高用量で誘導率は低下したものの、用量依存的に顕著な誘導を示し、リファンピシンを含まない培養液に交換することで誘導からの回復が認められた。CYP3A5 mRNA は CYP3A4 mRNA と同様に、CYP 酵素の発現に関与する核内レセプターの PXR を介して誘導されることが知られており (Burk et al., 2004)、CYP3A4 mRNA と同様に顕著な誘導を示した。オメプラゾールの暴露により、CYP1A1 mRNA および CYP1A2 mRNA は用量依存的な顕著な誘導を示し、オメプラゾールを含まない培養液に交換することで誘導からの回復が認められた。以上の結果より、本測定法は薬物代謝酵素の誘導や回復の実験に利用できることを明らかにした。さらに、ヒト肝細胞を移植したキメラマウスの肝臓試料を用いて、ヒト薬物代謝酵素およびトランスポーター mRNA の発現解析を行い、ドナーのヒト肝臓試料と比較した。ヒトとマウス肝臓の total

RNA を用いて、ヒトとマウスの mRNA 分析に使用したプライマーとプローブの特異性を調べた結果、107 組のヒトターゲット mRNA、ヒトのハウスキーピング遺伝子である GAPDH、 $\beta$ -actin とマウスの交差性、および 5 組のマウスターゲット mRNA とヒトの交差性はいずれも小さく、特異的な分析法と考えられた。

Fig. 1 に、キメラマウスに発現しているヒト薬物代謝酵素とトランスポーターの発現プロファイルをドナー肝臓と比較し、その頻度をヒストグラムで示した。

発現比率の頻度は、107 種類のターゲット遺伝子を各 3 例で解析し、全体として 321 例のデータを対象とした。発現比率の頻度

の中央値は 0.46 で、キメラマウスの置換率よりも低かった。また、ターゲット遺伝子の mRNA 発現比率は 7 種類が 1.0 以上を、8 種類が 0.1 以下を示した。一方、マウス Cyp mRNA は Cyp2b10 以外の発現がわずかであった。このように、キメラマウス肝臓はヒト肝臓試料として十分に機能すると考えられた。

ヒト肝細胞と、その肝細胞をドナーとして移植したキメラマウスの肝細胞を用いて、ヒト薬物代謝酵素 mRNA の発現解析を行い、CYP mRNA の発現プロファイルならびに薬物に対する反応性を検討した。3 例のヒト凍結肝細胞と、その肝細胞をドナーとして作成したキメラマウスから得た凍結肝細胞を培養し、12 種類のヒト CYP mRNA 発現量について比較した。Fig. 2 に、培養 24 時間後と 48 時間後におけるキメラマウス肝細胞とドナーに用いたヒト肝細胞の CYP mRNA 発現量のデータから作成した分散図を示す。培養 24 時間後にヒト CYP mRNA 発現量を比較すると、両肝細胞間での発現量の相関係数は低かった。培養 48 時間後ではキメラマウス肝細胞のヒト CYP mRNA 発現量がヒト肝細胞と同程度になり、相関性は  $r=0.809$  と良好に推移することを見出し、キメラマウス肝細胞がヒト試料の代替となることを発見した。さらに、 $\beta$ -ナフトフラボンの暴露によるヒト CYP1A2 mRNA の誘導作用と、リファンピシン暴露による CYP3A4 mRNA の誘導作用を、3 例のヒトとキメラマウスの肝細胞で比較した。

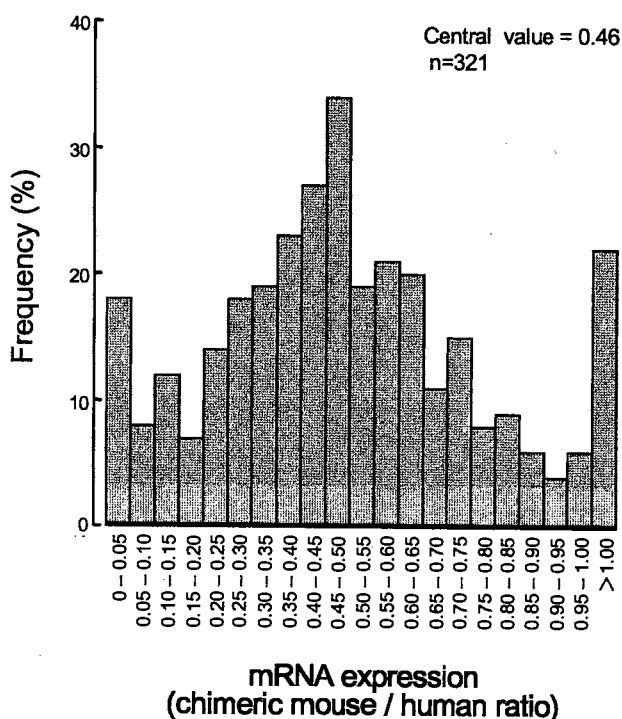


Figure 1. Histogram of the frequency of the mRNA expression ratios of human phase I enzymes, phase II enzymes and transporters in chimeric mouse liver. Data are shown as frequency of ratio of all targets mRNA (107 targets) in the three mice.

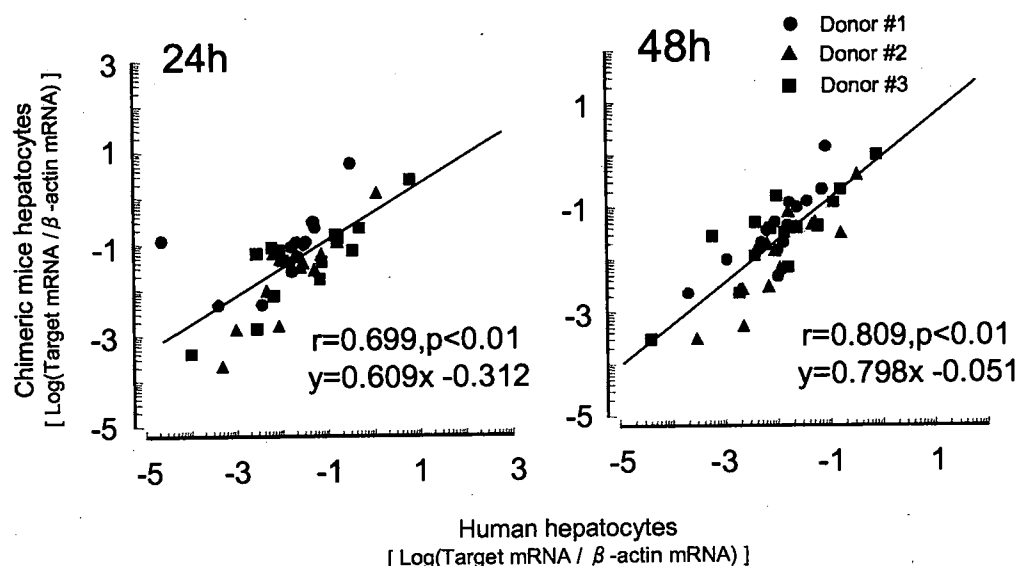


Figure 2. Correlation between mRNA levels of human CYPs expressed in hepatocytes from chimeric mice and donor after 24 h and 48 h of inoculation.

Expression of human CYPs mRNA in chimeric mouse and donor hepatocytes is shown on the y axis and x axis, respectively. Data are presented on a logarithmic scale. Data are expressed as ratios of human CYP1A1, CYP 1B1, CYP 1A2, CYP 2A6, CYP 2B6, CYP 2C8, CYP 2C9, CYP 2C18, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 2E1, CYP 3A4, CYP 3A5 and CYP3A7 mRNA to human  $\beta$ -actin mRNA in chimeric mouse and human hepatocytes.

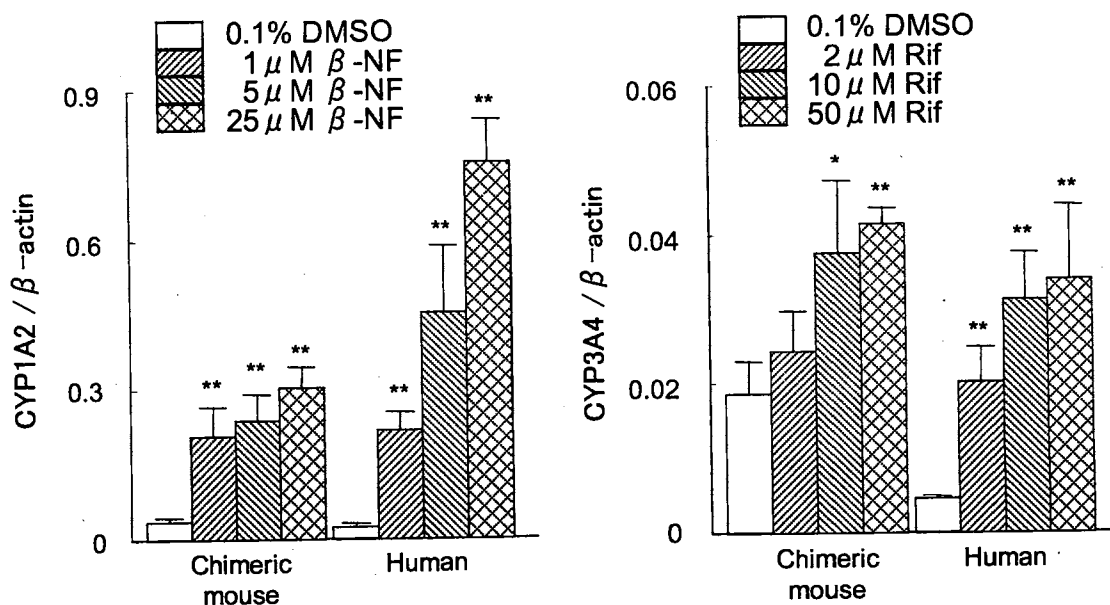


Figure 3. Effects of  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF) or rifampicin (Rif) exposure on expression of human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA in primary culture of hepatocytes from chimeric mouse and human.

$\beta$ -NF (1, 5 or 25  $\mu$ M) or Rif (2, 10 or 50  $\mu$ M) was exposed for 24 h after 48 h of inoculation. Ratios of human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA to human  $\beta$ -actin mRNA in chimeric mouse hepatocytes and human hepatocytes are shown on the y axis. Data represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* and \*\* denote significantly different from 0.1% DMSO control ( $p<0.05$  and  $p<0.01$ , respectively).

Fig. 3 に、ヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞に対して $\beta$ -ナフトフラボンあるいはリファンピシンを暴露した時のヒト CYP1A2 および CYP3A4 mRNA の変動について、代表的な 1 例を示す。 $\beta$ -ナフトフラボンの暴露によるヒト CYP1A2 mRNA は 3 例のヒトおよびキメラマウス肝細胞で同様の誘導が見られた。リファンピシンの暴露による CYP3A4 mRNA の誘導は、3 例のヒト肝細胞で誘導が見られたのに対し、キメラマウス肝細胞では 1 例は弱かったものの 3 例中 2 例の誘導が明確であった。全体として、キメラマウス肝細胞はヒト肝細胞より反応性がやや弱いものの、ほぼ同様のヒト CYP mRNA の誘導プロファイルを再現できることを明らかにした。

以上より、ヒト肝細胞を移植したキメラマウスより調製した肝細胞の培養系は、培養 48 時間になるとキメラマウス肝細胞はヒト肝細胞と同程度になり、ドナーの性状を反映した細胞系であることが明らかになった。さらに、誘導薬の暴露により、キメラマウス肝細胞は、ドナーのヒト肝細胞と同様のヒト CYP 誘導能を検出することができる優れた試験系であり、ヒト肝臓試料の代替になることを示した。

#### 引用文献

- Burk O, Koch I, Raucy J, et al.: J Biol Chem 279: 38379-38385, 2004  
Garcia M, Rager J, Wang Q, et al.: In Vitro Cell Dev Biol Anim 39: 283-287, 2003  
Hewitt NJ, Buhning KU, Dasenbrock J, et al.: Drug Metab Dispos 29: 1042-1050, 2001  
Li AP, Lu C, Brent JA, et al.: Chem Biol Interact 121: 17-35, 1999  
Roymans D, Van Looveren C, Leone A, et al.: Biochem. Pharmacol 67: 427-437, 2004

## 学位論文審査結果の要旨

薬物代謝酵素の誘導作用は薬物動態に大きな影響を与えるが、種差により動物実験からヒトの予測は困難な場合が多い。そのため、ヒト肝試料を用いた研究が薬物の酵素誘導作用に重要な示唆を与えることができる。本論文では、mRNA を指標として、ヒト肝細胞を移植したキメラマウスを用いたヒト CYP 誘導作用について検討した。第一に、ヒト薬物代謝酵素等の mRNA 発現量の網羅的かつハイスループットな分析法を開発し、ヒト肝細胞初代培養系に適用した結果、薬物代謝酵素とトランスポーターなど約 120 種の mRNA の発現を明らかにした。さらに、リファンピシンとオメプラゾールによる反応が検出できることを示した。第二に、ヒト肝細胞キメラマウスにヒト薬物代謝酵素 mRNA がドナー肝の発現量に対して平均で約 50% のレベルで発現していることを明らかにし、マウス Cyp mRNA は Cyp2b10 以外の発現がわずかであったことから、ヒト肝試料として有用であることを示した。第三に、ヒト肝細胞と、その細胞をドナーとして移植したキメラマウス肝細胞を用いて、培養によるヒト CYP mRNA の経時的変化から、培養 48 時間以降になると両細胞での発現量の相関性は良好に推移することを明らかにし、キメラマウス肝細胞がヒト試料の代替となることを示した。さらにβ-ナフトフラボンとリファンピシンによるヒト CYP1A2 mRNA および CYP3A4 mRNA の誘導作用を、ヒトとキメラマウスの肝細胞で比較した結果、キメラマウス肝細胞はヒト肝細胞とほぼ同様のヒト CYP mRNA の誘導プロファイルを再現できることを明らかにした。従って、本研究結果は臨床におけるヒト薬物酵素誘導を予測するための *in vitro* 実験系として期待される。以上より、博士(薬学)として評価できるものと判定した。